

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-201473

(43)Date of publication of application : 04.08.1998

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C12N 1/21
C12N 9/06
// C12Q 1/26
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 9/06
C12R 1:19)

(21)Application number : 09-007101 (71)Applicant : ASAHI CHEM IND
CO LTD

(22)Date of filing : 20.01.1997 (72)Inventor : SHIMIZU AKIRA
KOGA SHINJI

(54) FRUCTOSYL AMINE OXIDASE-PRODUCTIVE SUBSTANTIALLY PURE ORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a pure microorganism that efficiently produces fructosyl amine oxidase by transformation with a DNA having a base sequence that codes for the amino acid sequence of fructosyl amine oxidase having specific amino acid sequences.

SOLUTION: This fructosyl amine oxidase-productive microorganism is obtained by transforming a microorganism with a DNA having a base sequence that codes for an amino acid sequence of fructosyl amine oxidase having amino acid sequences 1 to 440 in the amino acid sequence of the formula. The transformed microorganism belongs to Escherichia coli, such as Escherichia coli DH1.pFOD7 (FERM P-15943), and the fructosyl amine oxidase is preferably produced by culturing this transformed

```

182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 26
```

microorganism in a culture medium under aerobic condition, and collecting the fructosyl amine oxidase from the culture medium.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.08.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3775873

[Date of registration] 03.03.2006

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-201473

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月4日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
1/21		1/21	
9/06		9/06	Z
// C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	
(C 1 2 N 1/21			

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-7101	(71) 出願人	000000033 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
(22) 出願日	平成9年(1997) 1月20日	(72) 発明者	清水 昌 京都府京都市右京区常磐山下町6番地の9
		(72) 発明者	古賀 晋二 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭 化成工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 フルクトシルアミノキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物

(57) 【要約】

【課題】 フルクトシルアミノキシダーゼを効率よく生産する手段を得るものである。

【解決手段】 フルクトシルアミノキシダーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子、フルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子によって形質転換した遺伝子組換え微生物、当該微生物を培養してなるフルクトシルアミノキシダーゼの製造法。

【効果】 フルクトシルアミノキシダーゼ生産菌株に由来する染色体DNAライブラリーからフルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子の全DNA配列を明確とした新規なフルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子を分離でき、該フルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え微生物を利用することにより、高効率なフルクトシルアミノキシダーゼの生産を可能とした。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表1のアミノ酸配列の1から440で表されるアミノ酸配列を有するフルクトシルアミノキシダーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAによって形質転換されたものであることを特徴とするフルクトシルアミノキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物。

【請求項2】 形質転換された微生物が、エシェリヒア・コリに属する微生物である請求項1記載の微生物。

【請求項3】 形質転換されたエシェリヒア・コリに属する微生物が、プラスミドpFOD7によって形質転換された微生物である請求項1記載の微生物。

【請求項4】 形質転換されたエシェリヒア・コリに属する微生物が、エシェリヒア・コリDH1・pFOD7（微工研寄託、FERM P-15943）である請求項1記載の微生物。

【請求項5】 配列表1のアミノ酸配列の1から440で表されるアミノ酸配列を有するフルクトシルアミノキシダーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするフルクトシルアミノキシダーゼを

発現する実質上純粋なDNA。

【請求項6】 DNAが、配列表1の塩基配列の1から1320で表される塩基配列を有する請求項5記載のDNA。

【請求項7】 配列表1のアミノ酸配列の1から440で表されるアミノ酸配列を有するフルクトシルアミノキシダーゼをコードする塩基配列を有するDNAによって形質転換された微生物であるフルクトシルアミノキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からフルクトシルアミノキシダーゼを採取することを特徴とするフルクトシルアミノキシダーゼの製造法。

【請求項8】 形質転換された微生物が、エシェリヒア属に属するフルクトシルアミノキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物である請求項7記載のフルクトシルアミノキシダーゼの製造法。

【請求項9】 形質転換された微生物が、エシェリヒア・コリDH1・pFOD7（微工研寄託、FERM P-15943）である請求項7記載のフルクトシルアミノキシダーゼの製造法。

【請求項10】 培養において28℃以下で培養する請求項7記載のフルクトシルアミノキシダーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はフルクトシルアミノキシダーゼを発現する実質上純粋なDNA、フルクトシルアミノキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物及びフルクトシルアミノキシダーゼの製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血液中のグルコースは遊離のアミノ基（主にリジンのε-アミノ基）を持つ蛋白と結合し、シッフ塩基を形成してアルジミンとなる。この反応は可逆であり、生じた反応物は不安定であるが、それに続く不可逆性のアマドリ転移によって、安定したケトアミンとなる。このような糖化蛋白を総称してフルクトサミンと呼ぶ。フルクトサミンの60から70%はグリケイテッドアルブミンであると言われている。アルブミンの半減期が約2週間であることから、フルクトサミンは約2週間前の血糖値を反映すると言われている。

【0003】糖尿病患者における血液中のグルコース濃度は健康人と比較して高いことから、フルクトサミンの濃度も高くなることが知られている。血糖値は食事の影響を大きく受けることから、食事の影響を受けないフルクトサミンは、糖尿病患者の血糖コントロール指標として有用である。フルクトサミンの定量法としては、アフィニティークロマトグラフィー法（Diabetes, 第29巻、1044-1047ページ、1980年）、HPLC法（J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 第19巻、81-87ページ、1981年）、（FEBS Lett., 第71巻、356-360ページ、1976年）等があるが、いずれも操作が煩雑な上、精度に問題があった。

【0004】上記の方法に代わって、最近多く用いられているのがアルカリ溶液中でのフルクトサミンの還元能を利用してNBT（ニトロブルーテトラゾリウム）を還元し、ホルマザン生成物の吸光度（550nm）を測定するものである。この方法は迅速であり、臨床検査に用いるために種々の分析機で自動化されている。しかし、試料中の夾雑物質の影響を受けることから特異性が疑問視されていた。そこで、簡便でかつ夾雑物質の影響を受けないフルクトサミンを測定する方法が望まれていた。

【0005】フルクトサミンを含むアマドリ化合物の定量法としてコリネバクテリウム（Corynebacterium）属由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いた方法が報告されている（特開昭61-268178号公報）。しかしこの方法はα-アミノ酸のアマドリ化合物に対しては作用するがε-アミノ酸に対しては作用しない（特開平3-155780号公報）。フルクトサミンは、タンパク質中のε-アミノ酸であるリジン残基に糖が結合したものである（Diabetologia, 第26号、93-98ページ、1984年）ことから、この方法はフルクトサミンの定量には使用できなかった。

【0006】フルクトサミンのようなε-アミノ酸のアマドリ化合物にも作用する酵素として、アスペルギウス（Aspergillus）属由来のフルクトシルアミノオキシダーゼ（特開平3-155780号公報）、フサリウム（Fusarium）属、アクレモニウム（A

cremonium) 属、およびデバリオマイセス (Debaryomyces) 属由来のケトアミノキシダーゼ (特開平5-192193号公報) が知られている。しかし、いずれも培養に誘導物質としてフルクトシルグリシンやフルクトシルバリンなどのような合成基質を使用するにもかかわらず酵素生産能は非常に低い。加えて、真菌類は液体培養を行うと菌体が培地の半分もの体積になり、また細胞壁が非常に強固であることから、微量の酵素を精製することは非常に困難である。さらに、血液中に存在するような低濃度のフルクトサミンを測定するには多量の酵素が必要であり、本酵素を供給する方法として現実的なものではあり得なかった。

【0007】このような状況下、フルクトシルアミノキシダーゼにおいてはε-アミノ酸に対する反応性や生産菌株の酵素生産性が非常に低いことから、ε-アミノ酸に対して反応性の高い酵素を効率よく生産し、容易に抽出・精製できる微生物の開発が望まれていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような実情のもとで、フルクトサミンの定量に有用なε-アミノ酸に反応性の高いフルクトシルアミノキシダーゼを検索し、この酵素を効率よく生産する微生物を開発し、さらにこの微生物を用いて該酵素を量産する方法を提供することを目的としてなされたものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記目的を達成するために鋭意研究を重ね、自然界および公知の分離株についてフルクトシルアミノキシダーゼを産出する株を探索した結果、特に真菌類に広く存在することがわかった。その中で特にフサリウム・オキシスポルム (Fusarium oxysporum) IFO-9972のフルクトシルアミノキシダーゼ生産能が高いことがわかった。

【0010】そこで、本菌株から該酵素を精製し、該酵素の部分的アミノ酸配列を決定した。そして、該酵素を生産する微生物由来の染色体DNAライブラリーの中から、該酵素をコードする遺伝子DNAを決定した部分的アミノ酸配列から設計・合成したDNAプローブを用いてスクリーニングし、得られたDNA断片から該酵素をコードしない領域 (5' および 3' ノンコーディング領域並びにイントロン) を部位特異的変異法を用いて除去することで原核生物において遺伝子発現が可能でかつ容易に発現する構造に変換した後、この遺伝子を用いて発現ベクターを構築し、例えばエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) に属する微生物に導入して形質転換微生物を作出し、これを特に培地中で低温にて培養することによって、該フルクトシルアミノキシダーゼを効率よく量産することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明は、配列表1のアミノ酸

配列の1から440で表されるアミノ酸配列を有するフルクトシルアミノキシダーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAによって形質転換されたものであることを特徴とするフルクトシルアミノキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物、配列表1のアミノ酸配列の1から440で表されるアミノ酸配列を有するフルクトシルアミノキシダーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とするフルクトシルアミノキシダーゼを発現する実質上純粋なDNA、配列表1のアミノ酸配列の1から440で表されるアミノ酸配列を有するフルクトシルアミノキシダーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAによって形質転換されたフルクトシルアミノキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物を培地に培養し、次いでその培養物からフルクトシルアミノキシダーゼを採取することを特徴とするフルクトシルアミノキシダーゼの製造法を提供するものである。

【0012】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において使用されるフルクトシルアミノキシダーゼ生産菌は、フサリウム・オキシスポルム IFO-9972株であり、本菌の生産するフルクトシルアミノキシダーゼの性状は以下の通りである。

・フルクトシルアミノキシダーゼの活性測定法

・反応液組成

50 mMのトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)

0.03%の4-アミノアンチピリン

0.02%のフェノール

4.5 u/mlのパーオキシダーゼ

1 mMのZFL (α-カルボベンズオキシ-ε-D-フルクトシル-L-リジン)

上記の反応液1 mlを小試験管に入れ、37℃で5分間予備加温した後、適当に希釈した酵素液0.02 mlを添加して攪拌し、反応を開始する。正確に10分間反応の後に、0.5%のSDSを2 ml添加して反応を停止し、波長500 nmの吸光度を測定する (As)。また盲検として酵素液のかわりに蒸留水0.02 mlを用いて同一の操作を行って吸光度を測定する (Ab)。この酵素使用の吸光度 (As) と盲検の吸光度 (Ab) の吸光度差 (As - Ab) より酵素活性を求める。別にあらかじめ過酸化水素の標準溶液を用いて吸光度と生成した過酸化水素量との関係を調べておく。37℃、1分間に1 μMの過酸化水素を生成する酵素量を1 Uと定義し、計算式は下記の通りである。

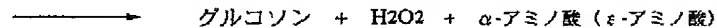
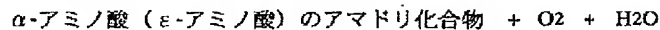
酵素活性 (U/ml) = (As - Ab) × 1.16 × 酵素の希釈率

(1) 基質特異性

ZFL	100%
D-フルクトシル-L-アラニン	104%
ε-D-フルクトシル-L-リジン	81%
D-フルクトシル-L-バリン	10%

(2) 酵素作用

下記に示すように、少なくとも α -アミノ酸、 ϵ -アミノ酸のアマドリ化合物を分解して、グルコソソと過酸化水素および対応する α -アミノ酸、 ϵ -アミノ酸を生成*



* する反応を触媒する。

【0013】

【化1】

【0014】(3) 分子量

本酵素の分子量はSephadex・G-100を用いたカラムゲル濾過法で、0.2MのNaCl含有0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.0)を溶出液として測定した結果、 $48,000 \pm 2,000$ 、SDS-PAGEでは $47,000 \pm 2,000$ であった。

(4) 等電点

キャリアアンフォライトを用いる焦点電気泳動法によって4℃、700Vの定電圧で40時間通電した後、分画し、各画分の酵素活性を測定した結果、pH4.3±0.2であった。

(5) Km値

50mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)

0.03%の4-アミノアンチピリン

0.02%のフェノール

4.5u/mlのパーオキシダーゼ

を含む反応液中で合成基質ZFLの濃度を変化させて、ZFLに対するKm値を測定した結果、0.194mMの値を示した。

(6) 至適pH

前記の酵素活性測定法に従い、反応液中の50mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に代えて100mMの酢酸緩衝液(pH4.4-5.4)、リン酸緩衝液(pH5.6-7.9)、トリス塩酸緩衝液(pH7.3-8.5)、およびグリシン水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.0-10.3)の各緩衝液を用いて測定した。この結果、pH7.5で最大の活性を示した。

(7) pH安定性
本酵素0.5Uを含有する0.5Mの至適pHを測定するときに用いた各種緩衝液0.5mlを40℃、10分間処理した後、その残存活性を後記の活性測定法に従って測定した。この結果、pH7.0-9.0の範囲で80%以上の活性を保持していた。

(8) 熱安定性

本酵素0.5Uを0.2Mのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で調製し、10分間加熱処理後、その残存活性を活性測定法に従って測定した。この結果、40℃までは残存活性として95%以上を保持した。

(9) 至適温度

40mMのトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を用い、活性測定法に従い、各温度で10分間反応後、0.5%のラウリル硫酸ナトリウム(以下SDSと略称する)溶液2mlで反応を停止し、波長500nmで吸光度を測定した。この結果、50℃で最大の活性を示した。

【0015】

【表1】

	フザリウム・ オキシスポルム IFO 9972	コリネバクテリウム sp.	アスペルギルス sp.	フザリウム・ オキシスポルム S-1F4	フザリウム・ オキシスポルム IFO 5880
分子量 (ゲル濾過)	48,000	88,000	83,000	45,000	106,000
分子量 (SDS-PAGE)	47,000	44,000	43,000	50,000	51,000
特異性 (U/mg)					
フルクトシルリジン	30	N.D.	11.28	48.9	18.5
フルクトシルバリン	3	7.09	59.8	N.D.	6.83
ミハエリス定数	0.194mM (ZFL)	0.74mM (FG)	2.2mM (FG)	0.22mM (FL)	0.37mM (FZL)
至適pH	7.7	8.3	7.7	8.0	8.5
至適温度	50	40	40	45	30~35
熱安定性	40	35	37	20~55	20~50
pH安定性	7~9	8~10	7.5~11	4~12	4~13
阻害剤	MnCl ₂ , NiCl ₂ , ZnSO ₄ CdCl ₂ , HgCl ₂ , PCMB			CuCl ₂ , ZnSO ₄ , AgNO ₃ HgCl ₂ , PCMB	ZnSO ₄ , AgNO ₃ HgCl ₂ , PCMB
等電点	4.3	4.6	6.8	4.8	6.8

【0016】以上の本酵素の理化学的性質と公知の酵素の性質を(表1)に示し比較した。その結果、分子量においてはコリネバクテリウム sp. 由来酵素は88,000、アスペルギルス sp. 由来酵素は83,000、フザリウム・オキシスポルム IFO 5880 由来酵素は106,000であるのに対し、本発明の酵素の分子量は48,000であり明らかに違う分子量であった。至適温度においてコリネバクテリウム sp. 由来酵素は

40℃、アスペルギルス sp. 由来酵素は40℃、フザリウム・オキシスポルム S-1F4 由来酵素は45℃、フザリウム・オキシスポルム IFO 5880 由来酵素は33℃であり、本発明の酵素の至適温度は50℃であり、明らかに異なっていた。阻害剤においては本発明の酵素がマンガンイオンやニッケルイオンによって阻害されるのに対してフザリウム・オキシスポルム S-1F4 由来酵素やフザリウム・オキシスポルム IFO 5880

由来酵素はマンガンイオンとニッケルイオン存在下に100%残存活性を示す阻害を受けない性質を有するものであった。基質特異性においては本発明酵素はフルクトシルリジンとフルクトシルバリンに作用し、フルクトシルグリシンには作用しなかった。コリネバクテリウム *s.p.* 由来酵素はフルクトシルリジンに作用しないことから、明らかに本発明酵素とは異なるもので、また血中のフルクトサミン（リジン残基のε位のアミノ基が糖化された蛋白）の測定には使用できない。フザリウム・オキシスポルム S-1 F4 由来酵素はフルクトシルバリンに作用しないことから明らかに本発明酵素とは異なるものであり、また血中のヘモグロビン A_{1c}（ヘモグロビン A_{1c}は血糖コントロールマーカーで、N末のバリン残基が糖化されている。）の測定には使用できない。以上の諸性質における差異が認められ、本酵素は新規な性質のものと認められる。

【0017】また、上記に示した本発明の新規な性質を有するフルクトシルアミノキシダーゼについて精製を行い、得られた電気泳動的に均一なフルクトシルアミノキシダーゼを用い、N末端側アミノ酸配列、シアノゲンプロミドなどを用いて化学的に切断した各ペプチド断片、およびリシルエンドペプチダーゼやアスパラギニルエンドペプチダーゼなどプロテアーゼを用いて消化した各ペプチド断片についてアミノ酸配列を決定し、フルクトシルアミノキシダーゼの部分的なアミノ酸配列を決定する。

【0018】次に、フルクトシルアミノキシダーゼを発現する遺伝子DNAをクローニングし、遺伝子工学的に該酵素を発現する形質転換微生物を作出する訳であるが、用いられるフルクトシルアミノキシダーゼを発現する遺伝子DNAは、例えば該酵素を生産する微生物由来の染色体DNAまたはcDNAライブラリーの中から、スクリーニングすることによって得ることができる。

【0019】本発明においては、前記のフルクトシルアミノキシダーゼを生産する微生物として、フザリウム・オキシスポルム IFO-9972 が好ましく用いられる。このフザリウム・オキシスポルム IFO-9972 から該酵素を発現する遺伝子DNAをスクリーニングする方法について説明する。まず、本菌の遺伝子ライブラリーを作製するにあたり、染色体DNAライブラリーを作製する場合、まず、該微生物の染色体DNAを通常用いられている方法によって抽出した後、適当な制限酵素で切断して、クローニング用ベクターに連結し、次いでこの組換えベクターを宿主微生物に導入して、 $10^4 \sim 10^5$ 個の形質転換宿主微生物のコロニーからなる染色体DNAライブラリーを作製する。

【0020】また、cDNAライブラリーを作製する場合は、全RNAを通常用いられている方法に従って調製した後、例えばオリゴdTカラムを用いてmRNAを精

製しても良いし、市販のキットを用いて直接mRNAを調製しても良い。調製したmRNAに適当な制限酵素部位を有するリンカーやアダプターを付加した後適当なクローニング用ベクターに挿入し、上記と同様に宿主微生物に導入してcDNAライブラリーを作製する。この際用いられる宿主微生物としては、組換えDNAが安定でかつ自律的に増殖可能であるものであれば特に制限されず、通常の遺伝子組換えに用いられているもの、例えばエシェリヒア属、バチルス属に属する微生物などが好ましく使用される。

【0021】宿主微生物に組換えDNAを導入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下に組換えDNAの導入を行ってもよいし、コンピテントセル法を用いてもよく、またバチルス属に属する微生物の場合には、コンピテントセル法またはプロトプラスト法などを用いることができるし、エレクトロポレーション法あるいはマイクロインジェクション法を用いてもよい。宿主微生物への所望組換えDNA導入の有無の選択については、組換えDNAを構成するベクターの薬剤耐性マーカーや栄養要求性マーカーに基づく選択培地で、該宿主微生物を培養し、生育する宿主微生物を選択すればよい。

【0022】一方、フルクトシルアミノキシダーゼ精製標品の部分的アミノ酸配列に基づいて種々のオリゴヌクレオチドを合成した後、例えばアイソトープで標識して標識オリゴヌクレオチドプローブを作製する。次いで、これらの標識オリゴヌクレオチドプローブを用い、従来慣用されている方法に従って、前記の染色体DNAまたはcDNAライブラリーの中から、フルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子を含むものをスクリーニングする。

【0023】次に、この目的の遺伝子DNAを含む形質転換された宿主微生物から、例えばマニアティスらの方法（Molecular Cloning Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989年）などに従って、フルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子DNAを含む組換えベクターを調製することができる。

【0024】次に、以上のようにして得たフルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子を発現用ベクターに組み込んで、発現ベクターを構築する。この発現用ベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージDNAまたはプラスミドDNAから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。前者のファージベクターとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、 λ gt \cdot λ C、 λ gt \cdot λ Bなどが用いられる。また、プラスミドベクターとしては、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合は、例えばpBR322、pBR325、pACYC184、pUC12、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、

pTV119N、pBluescriptSK+、pTrc99Aなどが用いられる。

【0025】さらに、バチルス属を宿主微生物とする場合は、例えばpHY300PLKなどを用いればよく、サッカロミセス属を宿主微生物とする場合は、例えばpYAC5などを用いればよい。また宿主微生物が原核生物である場合、フルクトシルアミンオキシダーゼ遺伝子を組み込んだ際に効率よく働くプロモーターが上流に存在するような構造の発現用ベクターが適しており、エシエリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pUC12、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pTV119N、pBluescriptSK+、pTrc99Aなどがこれに合致する。さらに、バチルス属を宿主微生物とする場合は、pHY300PLKなどが合致する。

【0026】これらのベクターに、該フルクトシルアミンオキシダーゼ遺伝子DNAを組み込む方法については特に制限はなく、従来慣用されている方法を用いることができる。しかし、該酵素生産菌であるフサリウム・オキシスポルムIFO-9972は真核生物であることから、該酵素遺伝子内にイントロンを保持している可能性がある。イントロンが存在している場合、エシエリヒア・コリなどの原核生物を宿主として活性発現させるためにはこのイントロンを除去しなければならない。この場合は、部位特異的変異法を応用して、イントロンを除去した後に結合させたいエクソン（タンパクをコードしている遺伝子部分）両末端と同じ配列を有する合成DNAを用いてイントロンを除去すればよい。また、宿主微生物での遺伝子の発現効率を上昇させるために、部位特異変異法を用いて低頻度遺伝子コドンを高頻度コドンに変換する作業が有効である。例えば宿主微生物がエシエリヒア・コリであれば、アルギニンをコードするエシエリヒア・コリでの低頻度遺伝子コドンAGGを、同じくアルギニンをコードする高頻度コドンであるCGGなどに変換する操作が一般的に行われる。また、フルクトシルアミンオキシダーゼ遺伝子を発現用ベクターに組み込むに先だって、遺伝子の上流部と下流部に部位特異変異法やPCR法を用いて、適当な制限酵素認識部位を作成しておくことも一般的な手法である。そして、適当な制限酵素を用いて、前記のフルクトシルアミンオキシダーゼ遺伝子DNAを含む組換えベクター及び発現用ベクターを処理し、それぞれフルクトシルアミンオキシダーゼ遺伝子を含むDNA断片及びベクター断片を得た後、それぞれの接着末端をアニーリング後、適当なDNAリガーゼを用いて結合させることによって、発現ベクターが得られる。

【0027】後述の実施例における発現ベクターは、前記のフルクトシルアミンオキシダーゼ遺伝子DNAを含む組換えプラスミドとして分離したpFOD1とプラスミドベクターpTV119Nから得られ、pFOD7と

命名されたものであり、その構成の模式図は図1に示すとおりである。このようにして、構築された発現ベクターをエシエリヒア・コリに属する微生物に導入し、該宿主微生物を形質転換させればフルクトシルアミンオキシダーゼを生産する実質上純粋な微生物が得られる。発現ベクターの導入及び選択方法については前述した方法を用いて行う。

【0028】本発明においては、前記組換えプラスミドpFOD7によって形質転換されたエシエリヒア・コリに属する微生物は、エシエリヒア・コリDH1・pFOD7（微工研寄託、FERM P-15943）と命名される。このようにして得られた形質転換微生物の培養は、該微生物の生育に必要な炭素源や窒素源などの栄養源や無機成分などを含む培地中において行うことができる。

【0029】該炭素源としては、例えばグルコース、デンプン、ショ糖、モラッセス、デキストリンなどが、窒素源としては、例えばペプトン、肉エキス、カゼイン加水分解物、コーンステープリカー、硝酸塩、アンモニウム塩などが、無機成分としては、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、亜鉛、マンガン、鉄などの陽イオンや塩素、硫酸、リン酸などの陰イオンを含む塩が挙げられる。

【0030】培養方法については特に制限はなく公知の方法、例えば通気攪拌培養、振盪培養、回転培養、静置培養などの方法によって行うことができるが、本発明に関しては、数々の検討を行った結果、エシエリヒア・コリの至適生育温度である37℃よりも低い28℃以下好ましくは25℃で、12時間から60時間程度培養する方法が好ましく用いられる。

【0031】このようにして培養を行ったのち、遠心分離処理などの手段によって菌体を集め、次いで酵素処理、自己消化、フレンチプレス、超音波処理などによって細胞を破壊して目的とする酵素を含有する抽出液を得る。この抽出液から、該酵素を分離、精製するには、例えば、塩析、脱塩、イオン交換樹脂による吸脱着処理などを行ったのち、さらに吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過、電気泳動法などによって精製すればよい。この精製酵素について適宜、ショ糖、グリセロール、アミノ酸等の安定化剤を0.1～5%添加して凍結乾燥してもよい。

【0032】この精製標品について、フルクトシルアミンオキシダーゼの酵素活性及び物理化学的性質を調べることによって、該形質転換微生物がフルクトシルアミンオキシダーゼの産生能を有することが確認された。したがって、本発明において用いたフルクトシルアミンオキシダーゼを発現する遺伝子DNAは、配列表1のアミノ酸配列の1から440で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、かつその塩基配列が配列表1の塩基配列の1から1320で表される塩基配列であること

が明らかである。

【0033】このようにして得られたフルクトシルアミノキシダーゼは、例えば血清中のフルクトサミン定量などの臨床用酵素として有用である。なお、本発明明細書に記載の塩基配列の記号及びアミノ酸配列の記号は、当該分野における慣用略号に基づくもので、それらの例を以下に列記する。また、すべてのアミノ酸はL体を示すものとする。

【0034】DNA：デオキシリボ核酸

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

C：シトシン

N：アデニン、チミン、グアニンまたはシトシン

R：アデニンまたはグアニン

Y：チミンまたはシトシン

Ala：アラニン

Arg：アルギニン

Asn：アスパラギン

Asp：アスパラギン酸

Cys：システイン

Gln：グルタミン

Glu：グルタミン酸

His：ヒスチジン

Ile：イソロイシン

Leu：ロイシン

Lys：リジン

Met：メチオニン

Phe：フェニルアラニン

Pro：プロリン

Ser：セリン

Thr：スレオニン

Trp：トリプトファン

Tyr：チロシン

Val：バリン

【0035】

【発明実施の形態】以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、実施例中、常法に従い、と記述した操作は、例えばマニアティスらの方法(T. maniatiss., et al., Molecular Cloning Second Edition., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989年)や、市販の各種酵素、キット類に添付された手順に従えば実施できるものである。また、実験に使用した組換えDNA実験酵素試薬(制限酵素など)、プラスミドDNA、キット類は特に指摘しない限り宝酒造株式会社より購入したものである。

【0036】

【実施例1】

<染色体DNAの分離>フサリウム・オキシスポルムIFO-9972菌株を2%のグルコース(和光純薬社製)、2%の酵母エキス(極東製薬工業社製)から成り、pH5.5に調整した培地100mlにて28℃で3日間振盪培養した後、この培養液を高速冷却遠心機(トミーCX-250型)を用い、6500rpm(7660G)で10分間遠心分離処理して、菌体を集菌した。

【0037】次いで、この菌体を50mMの酢酸緩衝液(pH5.5)、100mMのエチレンジアミン4酢酸(以下EDTAと略称する)(pH8.0)及び15%のシュクロースからなる溶液20ml中に懸濁し、最終濃度が2mg/mlとなるようにノボザイム(ノボノルディスク社製)を加え、25℃で30分間処理して菌株の細胞壁を破壊した。

【0038】次に、これに10%のSDS(シグマ社製)水溶液1mlを加えて、37℃で20分間処理した後、これに等量のフェノール：クロロホルム=1：1混合液を加え、10000rpm(12080G)で10分間遠心分離処理して水相を回収した。この水相に2倍量のエタノールを静かに重層し、ガラス棒でゆっくり攪拌しながら、DNAをガラス棒にまきつかせて分離した後、10mMのトリス-塩酸(pH8.0)及び1mMのEDTAからなる溶液20mlで溶解し、次いでこれに等量のフェノール：クロロホルム=1：1混合液を加え、前記と同様に処理して水相を分取した。

【0039】次に、この水相に2倍量のエタノールを加えて前記の方法でもう一度DNAを分離した後、10mMのトリス-塩酸(pH8.0)及び1mMのEDTAからなる溶液2mlに溶解した。

【0040】

【実施例2】

<フサリウム・オキシスポルムIFO-9972遺伝子ライブラリーの作製>実施例1で得られたフサリウム・オキシスポルムIFO-9972染色体5μgを30単位の制限酵素BglIIを用い、常法に従って37℃で2時間切断処理した。また、5μgのプラスミドベクターpUC119を30単位の制限酵素BamHIを用い、常法に従って37℃で2時間切断処理した。さらに5'末端を脱リン酸化するために、反応液に1単位のアルカリ性ホスファターゼを加えて65℃で2時間処理した。

【0041】次に、前記のようにして得られた2種のDNA溶液を混合し、この混合液に等量のフェノール：クロロホルム=1：1混合液を加えて処理した後、遠心分離処理によって水相を分取した。次いで、この水相に1/10量の3Mの酢酸ナトリウム溶液を加え、さらに2倍量のエタノールを加えて遠心分離処理することによってDNAを沈澱させた後、減圧乾燥した。

【0042】このDNAを100単位のT4DNAライ

ゲースを用い、常法に従って16℃で16時間ライゲーションを行った。次に、これを常法に従いコンピテント細胞としたエシェリヒア・コリDH1 (ATCC33849) [F⁻, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), SupE44, relA1, λ⁻] (T. maniatiss., et al. Molecular Cloning: Cold Spring Harbor, 504-506ページ, 1982年) にトランスフォーメーションし、これをアンピシリン50μg/ml含有3.7%のBHI寒天培地 (DIFCO社製) にて、37℃で一昼夜培養し、約8000株の形質転換微生物を得て、フサリウム・オキシスポルムIFO-9972遺伝子ライブラリーとした。

【0043】

【実施例3】

<放射性オリゴヌクレオチドプローブの作製>フルクトシルアミノキシダーゼ精製標品のリシルエンドペプチダーゼ処理断片、及びアスパラギンシルエンドペプチダーゼ処理断片のアミノ酸配列を調べたところ、配列表2から7のアミノ酸配列で表される6領域のアミノ酸配列が決定された。

【0044】この情報をもとに遺伝子の5'末端側から塩基配列を予想した。この予想された塩基配列には種々の組合せが考えられるので、組合せの数が少ない部分のオリゴヌクレオチドを設計した。すなわち、配列表2のアミノ酸配列の59番目のPheから65番目のAspをコードする20塩基のDNA配列を予想し、64通りの全ての塩基配列を有するDNAが混在するオリゴヌクレオチドFOD1を設計し、外部機関 (BEX社) に合成依頼して作成した。FOD1のDNA配列を配列表8に示した。

【0045】このようにして得られたオリゴヌクレオチド50ngを370キロボケレルの[γ-³²P]ATP (アマシャムジャパン社製) の存在下、8.5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを用い、常法に従って37℃で30分間反応させて、放射性同位元素³²Pを取り込ませ、放射性オリゴヌクレオチドプローブを作製した。

【0046】

【実施例4】

<フルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子含有DNAのスクリーニング>実施例2で得たフサリウム・オキシスポルムIFO-9972遺伝子ライブラリー、すなわち平板寒天培地上のアンピシリン耐性コロニーの上に、ナイロンメンブレンフィルター (アマシャムジャパン社製、ハイボンド-N+) を重ね、フィルター上に該コロニー菌体の一部を移行させた後、このフィルターをアルカリ変性溶液 (1.5MのNaCl, 0.5NのNaOH) 中に5分間浸し、さらに中和溶液 (0.5Mのトリス-塩酸 (pH7.0)、3MのNaCl) に5分間浸

漬後、乾燥させた。

【0047】次に、このフィルターを80℃で2時間加熱し、菌体中にあったプラスミドDNAをフィルターに固定した。さらに、このフィルターをブレイブリダイゼーション溶液 (1.8MのNaCl, 0.18Mのクエン酸ナトリウム, 0.05%のニリン酸ナトリウム, 0.1%のSDS, 0.1%のフィコール, 0.1%のポリビニルピロリドン, 0.1%のウシ胎児血清アルブミン (以下BSAと略称する) (シグマ社製), 0.01%のサケ精子DNA (ベーリンガー・マンハイム社製)) に浸し、37℃で一昼夜ブレイブリダイゼーションを行った。

【0048】その後、フィルターをハイブリダイゼーション溶液 (1.8MのNaCl, 0.18Mのクエン酸ナトリウム, 0.05%のニリン酸ナトリウム, 0.1%のSDS, 0.1%のフィコール, 0.1%のポリビニルピロリドン, 0.1%のBSA, 0.002%のエシェリヒア・コリ由来トランスファーRNA (ベーリンガー・マンハイム社製)) に浸した後、実施例3で得られた放射性オリゴヌクレオチドプローブを加え、37℃で24時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0049】ハイブリダイゼーション後、洗浄液 (1.8MのNaCl, 0.18Mのクエン酸ナトリウム, 0.05%のニリン酸ナトリウム) でフィルターを3回洗浄した後、42℃の洗浄液に10分間浸し、余分なプローブを洗い落とした。ついで、フィルターを風乾後、X線フィルム (富士写真フィルム社製、NewRXO-H) に重ね、遮光下-80℃で24時間オートラジオグラフィを行った。

【0050】その後、フィルムを現像したところ、ポジティブシグナルを示すコロニーを確認した。該コロニーをフルクトシルアミノキシダーゼをコードするDNAを含む形質転換体エシェリヒア・コリDH1・pFOD1と命名した。

【0051】

【実施例5】

<組み換えプラスミドの抽出>上記実施例4で取得したエシェリヒア・コリDH1・pFOD1を、3.7%のBHI培地にて37℃で一昼夜培養した後、常法に従ってフルクトシルアミノキシダーゼをコードするDNAを含む組み換えプラスミドpFOD1を抽出した。該プラスミド中のフサリウム・オキシスポルムIFO-9972染色体由来の部位のDNA配列をジデオキシ法 (Science, 第214巻, 1205-1210ページ, 1981年) により決定し、フルクトシルアミノキシダーゼをコードする全DNAが含まれていることを確認すると共に、その全塩基配列を決定した。

【0052】また、今回解析したフルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子がコードするアミノ酸配列は、実施例3で決定したフルクトシルアミノキシダーゼの6種の

部分アミノ酸配列とも完全に一致した。さらに配列表1のDNA配列の78番目のTと79番目のCの間に、48bpのイントロンが存在することが判明した。

【0053】

【実施例6】

<エシェリヒア・コリ宿主フルクトシルアミンオキシダーゼ発現用プラスミドの作製>フルクトシルアミンオキシダーゼの遺伝子中のイントロンをクンケルの部位特異変異法(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 第82巻、488ページ、1985年)により除去するために、DNA変異用オリゴヌクレオチドプライマーFOD2を設計し、外部機関(BEX社)に合成依頼して作成した。FOD2のDNA配列を配列表9に示した。また、実施例5で得られたプラスミドpFOD1を部位特異変異用実験キットMutan-K(宝酒造社製)に添付されたエシェリヒア・コリCJ236株に常法に従って導入し、添付のマニュアルに従って1本鎖DNA状のpFOD1を調製した。この2μgの一本鎖DNA状のpFOD1を鋳型DNAとし、1μgのFOD2を変異用プライマーとして、Mutan-Kを用い、添付のマニュアルに従って部位特異変異を行い、イントロンを除いたDNA鎖を含有するプラスミドを合成した。

【0054】このプラスミドをMutan-Kに添付のエシェリヒア・コリBMH71-18mutS株に常法に従って導入し、組換え菌体数コロニーから組換えプラスミドを抽出し、10単位の制限酵素SalIで、添付のマニュアルに従って37℃で2時間切断処理し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、新たにSalI部位が導入されているプラスミドを確認、選択した。

【0055】この組換えプラスミドを再びエシェリヒア・コリDH1株に形質転換し、組換えプラスミドを抽出し、SalI部位が導入されていることを確認した。以上により得たプラスミドをpFOD2と命名した。次にフルクトシルアミンオキシダーゼ構造遺伝子の上流と下流に制限酵素認識部位をクンケルの部位特異変異法により導入するために、オリゴヌクレオチドFOD3とFOD4を設計し、それぞれ外部機関(BEX社)に合成依頼して作成した。FOD3のDNA配列を配列表10に、FOD4のDNA配列を配列表11に示した。また、プラスミドpFOD2を部位特異変異用実験キットMutan-Kに添付されたエシェリヒア・コリCJ236株に常法に従って導入し、添付のマニュアルに従って一本鎖DNA状のpFOD2を調製した。この2μgの一本鎖DNA状のpFOD2を鋳型DNAとし、1μgのFOD3と1μgのFOD4を変異用プライマーとして、Mutan-Kを用い、添付のマニュアルに従って部位特異変異を行い、NcoIとHindIIIの認識部位が追加されたDNA鎖を含有するプラスミドを合成した。

【0056】このプラスミドをMutan-Kに添付のエシェリヒア・コリBMH71-18mutS株に常法に従って導入し、組換え菌体数コロニーから組換えプラスミドを抽出し、10単位の制限酵素NcoIとHindIIIで、添付のマニュアルに従って37℃で2時間切断処理し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、新たにNcoIとHindIIIの認識部位が導入されているプラスミドを確認、選択した。以上により得たプラスミドをpFOD3と命名した。

10 【0057】さらに5μgのpFOD3を用い、制限酵素NcoI及びHindIIIそれぞれ10単位で添付のマニュアルに従って37℃で2時間切断処理し、0.7%アガロースゲル電気泳動で約1.4kbのFOD遺伝子を含むDNA断片を分離回収した。一方、5μgのエシェリヒア・コリ宿主プラスミドベクターpTV119Nを前記と同様に切断し、50mMのトリス塩酸(pH8.0)存在下に、1単位のアルカリ性ファクターを加え、65℃で2時間処理した。

20 【0058】次いで、前記のDNA溶液を混合し、実施例2と同様にライゲーション、トランスフォーメーションを行い、50μg/mlのアンピシリンを含有する3.7%のBHI寒天培地にまき、25℃で一昼夜培養した。このようにして、プラスミドベクターpTV119NのNcoI及びHindIII部位にフルクトシルアミンオキシダーゼ遺伝子を含む約1.4kbのDNA断片が挿入されたプラスミドpFOD7を保持する形質転換微生物を取得し、実施例3の方法で組換えプラスミドpFOD7を得た。

【0059】

30 【実施例7】

<エシェリヒア・コリ内でのフルクトシルアミンオキシダーゼの活性発現>実施例6で作製したプラスミドpFOD7を保持する形質転換微生物をアンピシリン50μg/ml及び1mMのIPTG(イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド)を含有する3.7%のBHI培地に37℃で一昼夜培養した後、培養液を1500rpmで1分間遠心分離処理して沈澱を回収した。この沈澱に、該培養液と同量の10mMのトリス塩酸(pH8.0)を加え、超音波破碎を行った。

40 【0060】この破碎液を適宜希釈した後、20μlとり、前記に示した酵素活性測定法にてフルクトシルアミンオキシダーゼ活性を定量した。なお、比較のためにpTV119Nのみをトランスフォーメーションしたエシェリヒア・コリDH1の破碎液についても前記と同様の処理を行い、フルクトシルアミンオキシダーゼ活性を測定した。その結果、プラスミドpFOD7を保持した形質転換微生物での活性は0.08U/mlであったが、pTV119Nを持つものの活性は検出できなかった。これより、フルクトシルアミンオキシダーゼ活性をもつ形質転換体が得られていることが確認された。この形質

転換体をエシェリヒア・コリDH1・pFOD7 (*Escherichia coli*・DH1・pFOD7) (微工研寄託、FERM P-15943) と命名した。

【0061】このようにして得られたフルクトシルアミノキシダーゼを単離・精製し、発現蛋白の理化学的性質を確認し、フサリウム・オキシスポルムIFO-9972のフルクトシルアミノキシダーゼと同一であることを確認した。

【0062】

【発明の効果】本発明によるとフサリウム・オキシスポルムIFO-9972由来の染色体DNAライブラリーから、フルクトシルアミノキシダーゼを発現する遺伝子DNAをスクリーニングし、これを用いて構築された発現ベクターを例えばエシェリヒア・コリに属する微生物に導入することによって、得られた形質転換微生物は効率よくフルクトシルアミノキシダーゼを生産することができる。

10

*【0063】また、本発明によって、初めてフルクトシルアミノキシダーゼの全アミノ酸配列及びこのアミノ酸をコードする遺伝子DNAの塩基配列が決定できたので、該酵素の基質及び補酵素特異性の変換や耐熱性の向上などのプロテインエンジニアリングが可能となった。

【0064】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1320

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：フサリウム・オキシスポルム

株名：IFO-9972

配列の名称：フルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子

配列の特徴

* 1-1320 P CDS

配列

GCC TCA ACT CTC ACC AAA CAG TCC CAA ATT CTC ATC GTT GGT GGC GGA	48
Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly	
1 5 10 15	
ACT TGG GGA TGC TCA ACT GCC CTC CAT CTC GCC CGT CGG GGT TAC ACC	96
Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr	
20 25 30	
AAC GTC ACT GTT CTC GAT GTC AAT CGC ATC CCG TCA CCG ATA TCA GCC	144
Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala	
35 40 45	
GGG CAT GAT GTA AAC AAA CTT GCT GGC CGA CTG TCG ACT GCC GAT AGC	192
Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser	
50 55 60	
AAA GGT GAT GAT GAA GAC TCA ATC TGG AAA GCA CTT AGC TAC GCC GCA	240
Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala	
65 70 75 80	
GCT CAA GGA TGG CTC CAC GAC CCT GTC TTC CAA CCA TTC TGC CAC AAT	288
Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn	
85 90 95	
ACA GGC TCT GTC GTG GCT GGC TCA ACA CCA AAG TCT ATC AAG CAG CTG	336
Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu	
100 105 110	
GTA GAA GAT GAG ATC GGT GAC GAC ATC GAC CAG TAT ACA CCT CTC AAC	384
Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn	
115 120 125	
ACA GCA GAA GAT TTC AGA AAG ACC ATG CCT GAG GGT ATC CTG ACA GGT	432
Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly	
130 135 140	
AAC TTT CCA GGC TGG AAG GGC TTT TAC AAG CCC ACG GGT TCT GGT TGG	480
Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp	
145 150 155 160	
GTT CAT GCT CGA AAA GCT ATG AAA GCT GCT TTC GAA GAG AGC GAG AGG	528

21		22
	Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg	
	165 170 175	
	CTT GGT GTC AAA TTC ATC ACT GGC TCT CCC GAA GGA AAG GTG GAG AGT	576
	Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser	
	180 185 190	
	CTG ATC TTT GAA GAC GGC GAT GTT CGA GGT GCC AAG ACG GCA GAT GGT	624
	Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly	
	195 200 205	
	AAG GAG CAC AGA GCG GAT CGA ACT ATT CTT TCC GCT GGT GCT TCA GCA	672
	Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala	
	210 215 220	
	GAG TTC TTC CTC GAT TTT GAG AAC CAG ATC CAG CCT ACG GCG TGG ACC	720
	Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr	
	225 230 235 240	
	CTG GGC CAT ATC CAG ATG ACA CCA GAA GAA ACC AAG CTG TAC AAG AAC	768
	Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn	
	245 250 255	
	CTG CCA CCT CTT TTC AAC ATC AAC CAA GGT TTC TTC ATG GAA CCT GAT	816
	Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp	
	260 265 270	
	GAG GAT CTT CAT CAA CTC AAG ATG TGC GAT GAA CAT CCG GGC TAC TGC	864
	Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys	
	275 280 285	
	AAC TGG GTT GAA AAG CCT GGT TCT AAG TAC CCC CAG TCC ATC CCC TTC	912
	Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe	
	290 295 300	
	GCA AAG CAT CAA GTG CCA ACC GAG GCT GAA CGA CCG ATG AAG CAG TTT	960
	Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe	
	305 310 315 320	
	CTG AAA GAT ATC ATG CCT CAG CTT GCA GAT CCG CCG CTT GTT CAT GCT	1008
	Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala	
	325 330 335	
	CGA ATC TGC TGG TGC GCT GAT ACA CAG GAT AGA ATG TTC CTG ATC ACC	1056
	Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr	
	340 345 350	
	TAT CAT CCT CGA CAT CCC TCA CTT GTC ATT GCT TCA GGT GAT TGC GGC	1104
	Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly	
	355 360 365	
	ACG GGT TAC AAG CAT ATC ACA TCA ATT GGA AAG TTC ATC TCT GAC TGT	1152
	Thr Gly Tyr Lys His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys	
	370 375 380	
	ATG GAG GGT ACG CTT GAG GAA AGG TTT GCC AAG TTC TGG AGA TGG CGA	1200
	Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg	
	385 390 395 400	
	CCA GAG AAG TTT ACC GAG TTC TGG GGT AAA GAT CCT CTG GAT CCG TTT	1248
	Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe	
	405 410 415	
	GGA GCT GAC GAT AAG ATC ATG GAT TTG CCC AAG AGT GAT GTA GAG CGA	1296
	Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly	
	420 425 430	

23

24

TGG ACA AAT ATC AAG AAT GAT ATC
 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile
 435 440

1320

配列番号: 2

配列の長さ: 109

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

※フラグメント型: 中間部フラグメント
 起源

生物名: フサリウム・オキシスポルム

株名: IFO-9972

*

配列

Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala Glu
 1 5 10 15
 Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Arg Pro Thr Ala Trp Thr Leu
 20 25 30
 Gly His Ile Gln Met Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn Leu
 35 40 45
 Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp Glu
 50 55 60
 Asp Leu His Gln Leu Lys Met Xaa Asp Glu His Pro Gly Tyr Xaa Asn
 65 70 75 80
 Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe Ala
 85 90 95
 Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys
 100 105

配列番号: 3

配列の長さ: 56

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

※フラグメント型: 中間部フラグメント
 起源

生物名: フサリウム・オキシスポルム

株名: IFO-9972

*

配列

Asp Xaa Gly Thr Gly Tyr Lys His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Ser Asp Xaa Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Phe Trp
 20 25 30
 Arg Trp Arg Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu
 35 40 45
 Asp Arg Phe Gly Ala Asp Asp Lys
 50 55

配列番号: 4

配列の長さ: 58

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

★フラグメント型: 中間部フラグメント
 起源

40 生物名: フサリウム・オキシスポルム

株名: IFO-9972

★

配列

Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser Lys Gly Asp Asp Glu Asp
 1 5 10 15
 Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Trp Leu His
 20 25 30
 Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Xaa His Asn Thr Gly Ser Val Val Ala
 35 40 45
 Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Leu Val

25

26

50

55

配列番号: 5

配列の長さ: 49

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

※フラグメント型: 中間部フラグメント

起源

生物名: フサリウム・オキシスポルム

株名: IFO-9972

*

配列

Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn Thr Ala Glu Asp Phe Arg

1

5

10

15

Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly Asn Phe Pro Gly Trp Lys

20

25

30

Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp Val His Ala Arg Lys Ala

35

40

45

Met

配列番号: 6

配列の長さ: 43

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

※フラグメント型: 中間部フラグメント

起源

生物名: フサリウム・オキシスポルム

株名: IFO-9972

※

配列

Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly Thr Trp Gly Xaa Ser Thr

1

5

10

15

Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr Asn Val Thr Val Leu Asp

20

25

30

Val Asn Arg Ile Pro Xaa Pro Ile Xaa Ala Gly

35

40

配列番号: 7

配列の長さ: 31

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

★フラグメント型: 中間部フラグメント

起源

生物名: フサリウム・オキシスポルム

30 株名: IFO-9972

★

配列

Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala Arg Ile

1

5

10

15

Xaa Trp Xaa Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr Tyr

20

25

30

配列番号: 8

配列の長さ: 20

鎖の数: 一本鎖

☆トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸(合成DNA)

☆

配列

TTY ATG GAR CCN GAY GAR GA

20

Phe Met Glu Pro Asp Glu Asp

1

5

配列番号: 9

配列の長さ: 48

鎖の数: 一本鎖

◆トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸(合成DNA)

◆

配列

GTAAACAAAC TTGCTGGCCG ACTGTCGACT GCCGATACCA AAGGTGAT

48

配列番号: 10

配列の長さ: 24

鎖の数: 一本鎖

50 トポロジー: 直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

ACAATCACTA CCATGGCCTC AACT

24

配列番号：11

配列の長さ：23

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

*

配列

GAAGAGAAGC TTAGAATAGA AAC

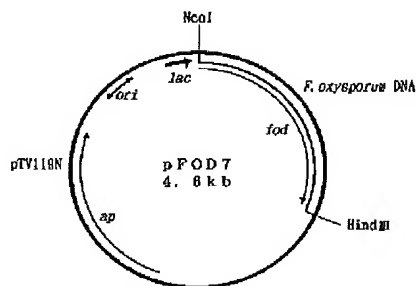
23

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はプラスミドpFOD7の構造を示す模式図である。図中の「fod」はフルクトシルアミノキシダーゼ遺伝子を、「ap」はアンピシリン耐性遺伝子を、「lac」はβ-ガラクトシダーゼ遺伝子由来プロ※

※モーター配列を、「ori」はプラスミド複製起点を示す。また、「NcoI」、「HindIII」は制限酵素認識部位を、「pTV119N」、「F. oxysporum DNA」はプラスミドの各領域の由来を示す。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/06

C 1 2 R 1:19)